

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-10159

⑬ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)1月12日

G 01 N 33/542

A

7906-2G

C 12 N 5/16

6712-4B※

C 12 P 21/08

審査請求 有 請求項の数 3 (全9頁)

⑮ 発明の名称 蛍光偏光免疫検定法原理によるタンパク質の測定方法およびハイブリッドクローン

⑯ 特 願 平1-45559

⑰ 出 願 平1(1989)2月28日

優先権主張 ⑱ 1988年2月29日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3806430.8

㉑ 発 明 者 クリスチヤン・クライ ドイツ連邦共和国ヴアイルハイム・ブリューテンシュト
ン ラーセ 16

㉒ 出 願 人 ベーリンガー・マンハ イム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
ドイツ連邦共和国マンハイム31・ザントホーフエル スト
ラーセ 116

㉓ 代 理 人 弁理士 矢野 敏雄 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

蛍光偏光免疫検定法原理によるタンパク質の
測定方法およびハイブリッドクローン

2 特許請求の範囲

1. 蛍光偏光免疫検定法原理によりタンパク質
を測定するに当り、均質系において試料溶液
を、

a) 蛍光性化合物で標識されていて、ジスル
フィド架橋を形成する2個のシステインを
含むアミノ酸6〜14個から成るペプチド
連鎖(同連鎖は被測定タンパク質のエピト
ープ連鎖に相応する)および

b) 前記タンパク質および前記ペプチド連鎖
に特異的な結合能力を有しかつタンパク質
の蛍光性ペプチド連鎖および天然タンパク
質に関して高々8倍だけ相違する分子相対
親和性を有する抗体

と一緒に同時に恒温保持しかつ恒温保持され
た溶液中に送られた偏光の偏光解消を測定す

ることを特徴とする蛍光偏光免疫検定法原理
によるタンパク質の測定方法。

2. ハイブリッドクローン3C4(ECACC
88022501)

3. ハイブリッドクローン2E6(ECACC
88022502)

3 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、蛍光偏光免疫検定法原理によるタ
ンパク質の測定方法に関する。

従来の技術

特に臨床分野における診断法の領域では最近
20年間に、放射線免疫検定法原理による方法
から出発して同検出法の変法が次第に開発され
た。これらの変法は特異的な結合能力を有する
物質の、次第に精密になつた独特な測定を許す。
極めて鋭敏な検出法として蛍光偏光免疫検定法
が開発された。この検定法は、蛍光性物質と例
えばヘプテンのような小さい分子とから成る複
合体が極めて迅速に溶液中で揺動され、この揺

液中に送られかつ蛍光性物質を励起する偏光が、入射と発光との間に起こる複合体の旋回によつて発光時には偏光解消されることを基礎にしている。この場合偏光解消度は複合体分子の旋回率に逆比例する。蛍光性物質をより大きい分子に結合させる場合、例えば蛍光で標識したハプテンを相応の抗体に結合させる場合、全複合体の運動は極めて限定されていて、偏光はそれが蛍光物質に入射する時点からそれが発光される時点までもはや偏光解消されずに偏光されて再び溶液から出る。

偏光解消は自体公知の装置で測定することができる。さて検出法に関しては前記挙動を利用する。そのために、特異的に結合可能の被測定パートナーの含有されている溶液中に、蛍光性物質を有する被測定パートナーから成る複合体および被検出物質ならびに蛍光標識分子の両者に結合可能な抗体を加え、偏光解消の減少を測定する。この際抗体の周りで溶液中に存在する結合パートナーと蛍光標識分子が競合する。次

(3)

問題点を解決するための手段

前記課題は、冒頭記載の方法において、均質系において試料溶液を、

- a) 蛍光性化合物で標識されていて、ジスルフィド架橋を形成する2個のシステインを含むアミノ酸8~14個から成るペプチド連鎖（同連鎖は被測定タンパク質のエピトープ連鎖に相応する）および
- b) 前記タンパク質および前記ペプチド連鎖に特異的な結合能力を有しかつタンパク質の蛍光性ペプチド連鎖および天然タンパク質に関して高々8倍だけ相違する分子相対親和性を有する抗体

と一様に同時に恒温保持しかつ恒温保持された溶液中に送られた偏光の偏光解消を測定することを特徴とする蛍光偏光免疫検定法原理によるタンパク質の測定方法によつて解決される。

本発明により使用される成分、すなわち蛍光性化合物で標識されたペプチドおよび抗体を用いて、大きい分子を溶液中で検出することが

(5)

に偏光解消の減少を介して、結合された蛍光標識物質の量を測定することができ、この量は被測定物質の溶液中の量の尺度である。

上記方法によつては、標識した結合パートナーおよび標識結合パートナーと抗体とより成る複合体の運動性の相違が重要である。このような相違は結合パートナーが小さい場合のみ起こる。したがつてハプテンに関しては該方法を極めて良好に実施でき、精密な結果が得られる。しかしより大きい分子を測定しようとする場合には、標識分子と、標識分子および抗体から成る複合体との間の分子の大きさの相違はもはや十分ではなく、偏光解消の減少を十分に正確に測定することができない。したがつてこの検出法は従来は大きな分子に関しては適用することができなかつた。

発明が解決しようとする問題点

本発明の課題は、大きいタンパク質分子に関しても溶液中で鋭敏に検出することのできる方法を提供することであつた。

(4)

きた。この検出は極めて鋭敏である。本発明により使用されるペプチド連鎖は、担体タンパク質に結合されて、同時にまた免疫のため、つまり必要な抗体を製造するためにも使用することができる。

本発明による方法は、特に体液中のタンパク質を測定するために用いられる。被測定タンパク質は免疫原性であり、したがつて抗原と称してもよい。該方法は例えばホルモン、酵素および他の生物学的活性高分子物質の検出に好適である。これらの物質は、適当な生体に注射されると免疫反応を惹起し、抗体の形成をもたらす。この場合免疫原性なのは、分子全体ではなく、エピトープと称される特定範囲である。一般には10個までのアミノ酸を包含しかつ分子の表面に存在する小さい範囲である。タンパク質はその表面にそのようなエピトープを多数有しているので、免疫の際、個々のエピトープに対応する多数の種々の抗体が形成される。さらにまた個々の抗体は、抗原に対する分子相対親和性

(6)

に因しても相違している。

分子量の高いタンパク質（蛍光偏光免疫検定法において偏光解消時に分析的に評価できる相違を生じない）の検出の場合には、本発明によれば蛍光性化合物とタンパク質とから成る複合体の代りに、蛍光性化合物と被測定タンパク質のエピトープ連鎖に相応するペプチド連鎖とから成る複合体を使用する。この場合エピトープ連鎖としては、2個のシステインを含む6～14個のアミノ酸の連鎖を使用する。2個のシステインはジスルフィド架橋を形成している。被測定タンパク質のエピトープ連鎖が3個以上のシステインを有する場合には、好ましくは蛍光標識ペプチドにおいて、限定されたジスルフィド化合物を得るためには、2個を除く全システインを他のアミノ酸、好ましくはアラニンと代える。エピトープ連鎖が3個以上のシステインを有する場合には、種々の位置にジスルフィド架橋を有する分子から成る混合物が生成される。この混合物のために抗体による^{検出}認識の際に種々

(7)

より行われなければならない。したがって好ましくはペプチドの両鎖端の一方に結合する。

また本発明による方法の場合には、被測定タンパク質および蛍光標識したペプチドに特異的な結合能力を有する抗体を使用する。正確な成績を得るためには、抗体は蛍光標識ペプチド連鎖および天然タンパク質に関して、高々8倍だけ相違する分子相対親和性を有しなければならない。分子相対親和性は自体公知の微量力価-ELISAによつて測定する。この測定のために天然タンパク質を塗布した微量力価板を、抗体および測定すべき物質（天然タンパク質、蛍光標識ペプチド）と一緒に同時に数種の希釈度グループにおいて恒温保持する。測定すべき物質は、同物質に対する抗体の親和性に応じておよび測定すべき物質の濃度に応じて抗体の抗原結合を阻止する。

抗体の結合は、例えば多クローン性抗-マウスFc・ヒンジ抗体-ペルオキシダーゼ複合体を用いる単クローン性マウス抗体の特異性試験

(9)

の懸念の生じる可能性がある。

ペプチドは自体公知の方法で製造する。ペプチドの合成法は一般に公知であつて、ここで詳述する必要はないであろう。

ペプチド連鎖は蛍光性物質で標識される。蛍光性化合物としては、短い蛍光半減期を有する化合物が適当である、つまり蛍光性物質は励起後にエネルギーを蛍光の形で極めて迅速に放出し、再び出発状態に復帰するのである。蛍光性物質としては、例えばフルオレシニンおよびその誘導体ならびにレゾルフィンである。極めて有利にはレゾルフィンを使用する。

蛍光性物質は、自体公知の方法でペプチド連鎖に結合される。結合は両成分の間で直接行われるかまたはスパーサを介して行われてもよい。結合の仕方は使用された蛍光性物質および使用されたペプチドに依存している。このための方法は当業者にとつて周知である。

ペプチドへの蛍光性物質の結合は、蛍光性物質が同ペプチドのエピトープ機能を妨害しない

(8)

の場合には、抗抗体-酵素複合体と一緒に恒温保持することによつて検出される。該結合は相応の酵素基質と一緒に恒温保持することによつて可視化される。

半最大結合に属する被測定分析体の濃度（ Mol/l ）を分子相対親和性と称する。抗体の測定すべき物質への結合が不良であればある程それだけ分子相対親和性の値は高くなる。

使用すべき抗体量は実験で確定する。天然タンパク質を施した微量力価板を、同様に種々の濃度の抗体のみと一緒に恒温保持し、同様に結合を測定する。分子相対親和性の上記測定の場合には、半最大結合の観察される抗体濃度を使用する。

適当な抗体は、例えば、適当な生体を免疫原としての被測定タンパク質で免疫し、次に蛍光標識ペプチドに対する抗体の結合強さに従つて抗体を選択することによつて得ることができる。同様に適当な生体を免疫原としてのペプチド連鎖で免疫し、次に天然タンパク質に対する抗体

の親和性に従って同抗体を選択することによって同種の抗体が得られる。

前記の選択は、多クローン性抗体の場合には免疫吸取によってまたは単クローン性抗体の場合にはスクリーニングによって行われる。

本発明方法によつては両種の抗体が適当である。しかし好ましくは単クローン性抗体を使用する。本発明方法の場合には1種の抗体のみを使用するので、同抗体が所望のエピトープに対して高特異性であり、実際には他の内生物質との交差反応性を有しない。

タンパク質を本発明により測定するためには、試料溶液を、蛍光標識ペプチド、および被測定タンパク質ならびに蛍光標識ペプチドに対して特異的な結合能力を有する抗体と一緒に恒温保持する。溶液中に送られた偏光の偏光解消の変化を測定する。この変化は結合された蛍光標識ペプチドの割合の程度である。次に標準曲線との比較によつて計算されうる蛍光標識ペプチドの量から溶液中の被測定タンパク質の量が自

公知の方法で計算される。

本発明の他の対象はハイブリドマクローン2E8および3C4である。これらのクローンはプラズマ細胞系により1988年2月25日に英国在EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES (ECACC) で寄託され、次の寄託番号を有している：2E8=ECACC 88022502、3C4=ECACC 88022501。これらの細胞系からヒトインシュリンのAループ-エピトープおよびこのエピトープの蛍光標識連鎖と極めて特異的に反応する単クローン性抗体が得られる。このような抗体は、蛍光偏光測定法でインシュリンの測定用に使用するのに適している。

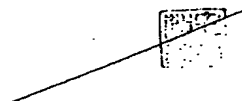
本発明により、タンパク質を極めて特異的にかつ極めて鋭敏に検出することのできる方法が提供される。さらに同方法に適当な単クローン性抗体が提供される。

次に本発明を図面および実施例により詳述する。
例1

01

ヒトインシュリンA鎖ループに相応するペプチド連鎖を合成する。半自動式ペプチド合成装置（スイス国ブーベンドルフ在Labortech社製）で固相合成を実施する。N-アミノ保護基としてFMOC [= (9-フルオレニル)-メトキシカルボニル] 基を使用した。

前記ペプチド合成法は、J. Meienhofer 等：Int. J. Peptide Protein Res. 13, 35-42 (1979) に記載されている。C末端FMOC-アミノ酸は、Meienhofer の記載のように、p-アルコキシベンジルアルコール樹脂（スイス国ブーベンドルフ在Bachem社）に結合した。
合成サイクルの記録：



02

段階	時間	試薬/溶剤
1	2×1min	DMF (ジメチルホルムアミド)
2	1×3min	ピペリジン/DMF 1:4
3	1×7min	ピペリジン/DMF 1:4
4	4×1/2min	DMF
5	2×1/2min	イソプロパノール
6	停止	ニンヒドリン試験
7	2×1min	DMF
8	停止	DMF 中の次のFmocアミノ酸およびHOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール) を加える
9	2 min	振盪
10	停止	DCM (ジクロロメタン) 中のDCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド) を加える
11	90 min	カップリング
12	3×1min	DMF
13	2×1min	イソプロパノール
14	停止	ニンヒドリン試験

03

04

洗浄 - およびカップリング段階の容量としてはその都度出発樹脂の重量の1.5倍を用いる。ニンヒドリン試験は、E. Kaiser : Anal. Bloch m. 34, 595~98 (1970) に記載されているように行い。14段階におけるニンヒドリン試験がなお遊離アミノ基を示す場合には、配位を8段階から反復する。8段階~11段階による結合に関しては、出発樹脂の負荷に対して3倍のモル量のFmocアミノ酸およびDCCを使用する。HOBtは4.5倍のモル量で使用する。

最後のN末端Fmocアミノ酸の結合後、Fmoc保護基を脱離するため、合成サイクルの1~5段階を実施する。次に樹脂を、1.5倍容量のジクロルメタン(DCM)/トリフルオル酢酸(TFA)1:1中で室温で2時間振盪する。伊過を行い、樹脂をジクロルメタン/トリフルオル酢酸4:1を用いてさらに2回洗浄し、全伊液を精製し、トルエンを加えつつ25℃で真空蒸発させる。残留物にジエチルエーテルを

05

tBu : t-ブチルエーテル

Trt : トリチル

OtBu : t-ブチルエーテル

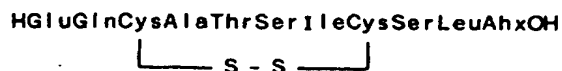
樹脂からペプチドを分離する前にシステインの保護基を脱離し、還元してジスルフィド架橋を形成させる。ヘキサフルオロイソプロパノール1.5mlとDCM 4.5mlとから成る混合物に試薬を飽和するまで加える。過剰な試薬は濾紙により伊取する。上記のようにして得られたペプチド樹脂500mgを加え、2時間振盪し、伊過を行い、DCM、DMFおよびイソプロパノールで各3回洗浄する。次に上記のようにして樹脂からペプチドを分離する。収量：粗生成物120mg。

粗生成物を、ポリゴシル(Polygosil) C 18 5μ、250×20mm (Bischoff社製)によりクロマトグラフィーにかけた。溶離液A : TFA 0.1%を含む水、溶離液B : TFA 0.1%を含む水中のイソプロパノール85% : 120分で20~80分。移動速度：3.5ml/min、

07

加える。固体を伊取し、乾燥する。

上記図式によると、A鎖ループ：



が合成される。出発樹脂としては5gのFmoc Ahx = ε-アミノヘキサ酸-p-アルコキシベンジルアルコール樹脂(負荷0.45mmol/g)を使用する。合成サイクルにおいては次下のFmocアミノ酸を順々に使用する：

1 Fmoc Leu	239g
2 Fmoc Ser(tBu)	259g
3 Fmoc Cys(Trt)	395g
4 Fmoc Ile	239g
5 Fmoc Ser(tBu)	259g
6 Fmoc Thr(tBu)	268g
7 Fmoc Ala	210g
8 Fmoc Cys(Trt)	395g
9 Fmoc Gln	249g
10 Fmoc Glu(OtBu)	313g

これらの結合は
それぞれ一度は
反復する

06

228nmで検出。

純物質47mgが得られる。

DC : (珪酸ゲル、展開剤 : n-ブタノール / 酢酸 / 水 4 : 1 : 1)

Rf : 0.44

FAB-MS (fast-atom bombardment 質量分析計) (正)MH⁺ : 1165 (計算値 : 1165.5)

得られたペプチド58mgを水1.5ml中に取り、この溶液を5% K₂CO₃溶液でpH 8.5に調節する。ジオキサン1.5ml中のN-(レゾルフィニルカルボニル)-サルコシン-N'-ヒドロキシスクシンイミドエステル21.5mgの溶液を加える。この試薬の製造は西独国特許出願公開第3526565号に記載されている。室温で20時間攪拌し、次にジオキサンを真空蒸発し、pHをトリフルオル酢酸を用いて2.2に調節する。レゾルフィンとペプチドとから成る複合体が沈殿する。この沈殿物を吸引し、0.1M NaHCO₃溶液中で溶解しかつ酸性化することによって再び酸

08

させる。A鎖ループ-レゾルフイン-サルコシン5mgが得られる。さらに集めた伊液にポリオシルC18によりクロマトグラフィーを施すとA鎖ループ-レゾルフイン-サルコシン0.8mgが得られる。

DC: (珪酸ゲル、展開剤-上記のとおり)

Rf: 0.58

例2

ヒトインシュリンに対する単クローン性抗体の製造

Balb/Cマウス(8~12週令)を、水酸化アルミニウムおよびボルデテラ・ペルツシス(*Bordetella pertussis*)に吸着されたヒトインシュリン100μgで腹腔内的に免疫した。6週後に3回の他の免疫を4週の間隔で行う。この場合その都度水酸化アルミニウムおよびボルデテラ・ペルツシスに吸着されたインシュリン50μgを腹腔内投与する。

最後の免疫のほぼ4ヵ月後融合を行う。この融合の4日前および3日前にそれぞれもう一回

インシュリン100μg/PBS(=磷酸塩緩衝塩水)を腹腔内および静脈内投与により免疫する。

融合のためには、Galfré: Methods in Enzymology, 73(1981), 3頁に従わず、免疫されたマウスの脾臓細胞 10^8 を骨髓腫細胞(P3×63-Ag 8.653, ATCC-CRL 8375) 2×10^7 を混合し、次に10分遠心分離する(300g, 4℃)。細胞をもう一回BSS(=平衡塩溶液)で洗浄し、400gで遠心分離する。上澄みを除去する。沈降細胞に60%PEG溶液(MG4000, Merk社)1mlを加える。次に室温でRPMI 1640培地(RPMI=Rosewell Parker Memory Institut)5mlをウシ胎児の血清(FKS)なしに加え、次にもう一回RPMI 1640培地5mlを10%FKSと共に徐々に加え、培地を増量して50%にし、400gで10分間遠心分離する。沈降細胞を10%FKSを含むPRMI 1640-培地中にとる。脾臓細胞各 2×10^5 を24well

(19)

(20)

-細胞培養板(Nunc社)上に植える。各培養物に骨髓細胞 1×10^5 または腹膜嚢出物細胞 5×10^4 を飼養細胞として加える。次の日にヒポキサンチン-アザセリン選択培地(ヒポキサンチン100mM、アザセリン1μg/ml)を加える。

約7~10日後にはすでに多数のクローンが見えてくる。一次培養物の上澄みを例3で記載したELISA法により試験する。抗原特異性抗体を含む一次培養物を、蛍光活性細胞選別器を用いて、96well-細胞培養板(Nunc社)でさらにクローン培養する。飼養細胞としては腹膜嚢出物細胞 1×10^4 または脾臓細胞 2×10^4 を用いる。

このようにして例えばハイブリドマクローン2E6(ECACC 88022502)および3C4(ECACC 88022501)を単離することができた。

腹水症を発生させるために、プリスタン(Pristan)0.5mlで1~2回前処理しておいた

マウスにハイブリッド 5×10^6 を腹腔内投与する。この投与から1~3週間後には同マウスから腹水症液を取ることができる。このものから常法で抗体を単離することができる。この単クローン性抗体はインシュリンに対して特異的に適合しており、プロインシュリンに対するその交差反応性は全くないかまたは少ししかない。

例3

インシュリンに対する抗体のスクリーニング試験

免疫されたマウスの血清中またはハイブリッドの培地上澄み中または腹水症液中でインシュリンに対する抗体の存在および特異性を検出するために、試験原理としてELISA法を用いる:

微量力価板に、インシュリン1μg/ml塗布用緩衝液(0.2M炭酸ナトリウム/重炭酸ナトリウム、pH9.3~9.5)を37℃で一晩中塗布する。0.9%塩化ナトリウム溶液および1%アルブミン溶液で10分間後処理する。次に0.9%塩化ナトリウム溶液で洗浄する。次に37℃で

(21)

(22)

1時間試料100 μ gと一緒に恒温保持し、再び0.9%塩化ナトリウム溶液で洗浄する。次にもう一度、ヒツジの抗マウスIgG-ペルオキシダーゼ複合体100~150mU/ μ lと一緒に恒温保持(37℃で1時間)を行う。0.9%塩化ナトリウムで再び洗浄した後ペルオキシダーゼ活性を常法で測定する[例えばABTSを用いる、室温で30分、吸光度差(405nmで Δ mE)を読取る]。

またELISA試験は次のように行うことができる:

先づ微量力価板に、ヒツジの抗マウスIgGを塗布する(20~30 μ g/ μ l塗布用緩衝液、37℃で1時間乃至一晩中)。次に前記のように処理し、試料溶液を加え、再び洗浄する。最後にインシュリン-ペルオキシダーゼ複合体250mU/ μ lと一緒に恒温保持する(37℃、1時間)。再び洗浄し、ペルオキシダーゼ活性を例えばABTSで測定する。

さらに抗体を、例4で記載するようインシ

四

ュリン産多クローン性抗体(マウスIgGのFc γ 部分に対応している)のFabフラグメントから成る複合体、試料緩衝液中113mU/ μ l
基質: 磷酸塩-クエン酸塩緩衝液(pH4.4)100mmol/l、過硫酸ナトリウム3.2mmol/l、ABTS(2,2'-アジノ-ジ-3エチル-ベンゾチアゾリン-スルホン酸(6)/ジアンモニウム塩)1.9mmol/l

抗体: インシュリン2E6および3C4に対するMAK

ペプチド誘導体: A鎖ループ(例1により製造)、A鎖ループ-レゾルフィン-サルコシン(例1により製造)

抗原: ヒトインシュリン

実際の特異性実験に供給すべき抗体の量は予備実験で測定する。このために微量力価板にインシュリンを塗布する。100 μ l容器当りインシュリン2.5 μ g/ μ l塗布用緩衝液を室温で1時間恒温保持する。次に溶液を吸引し、洗浄緩衝液で3回洗浄する。

四

ユリン-ペプチドの検出でスクリーニングする。

例4

材料

微量力価板: A: NUNC 4-42404 II

B: 2-69620

12管状ピペット: ダイナテック(Dynatech)、カタログNo. 77-887-00

扁平振盪器: Flow Laboratories、タイトルテック(Titertek)、カタログNo. 77-471-00

カバーシート: ダイナテックプレートシーラーズ(Plate Sealers)、カタログNo. M30
ELISA読取り器: ダイナテックMR700

塗布用緩衝液: 50mM炭酸ナトリウム、pH9.6

試料緩衝液: 10mM磷酸ナトリウム、pH7.4、0.9% NaCl、0.1% トウイーン(Tween) 20、1% クロタイン(Crotelin) C

洗浄緩衝液: 0.9% NaCl、0.1% トウイーン 20

抗体-酵素複合体: ペルオキシダーゼおよびヒ

四

次に固相結合インシュリンに抗体2E6または3C4(腹水症)の希釈度グループを加える。希釈は試料緩衝液を用いて1:100から5段階で行う。それぞれ室温で1時間恒温保持し、次いで洗浄する。

インシュリンに結合された抗体は、ペルオキシダーゼおよびヒツジ産多クローン性抗体(マウスIgGのFc γ 部分に対応している)のFabフラグメントから成る複合体を加えることによつて、ペルオキシダーゼと加えた基質との反応を介して測定する。検出反応はすべての容量に基質を加えることによつて開始される。測定は405nmでELTSA読取り器で行う(参照波長490nm)。

半最大結合の起る抗体希釈度を力価と定義する。この抗体量を次の実験で使用する。

単クローン性抗体の特異性を検べる。このために個々の抗体の反応性を、溶液中に存在する種々の成分と比較する。

1% クロタインCを前塗布した微量力価板に、

四

2倍の力価濃度の単クローン性抗体溶液50 μ lおよび抗原溶液またはペプチド誘導体の溶液(希釈度グループ、次下参照)50 μ lをビペットで加え、混合し、室温で30分恒温保持する。次に前記混合物のアリコート100 μ lを、インシュリンを塗布した微量力価板に移す。

希釈度グループ:

ヒトインシュリン

試料緩衝液

A緩ループ

10 μ g/ μ lから

A緩ループ-レゾルフィン-サルコシン 5段階で希釈

半最大結合に属する、被測定物質の濃度(mol/l)を、分子相対親和性と定義する。

例1からの非標識ペプチドに対するMAKs 2 E 8または3 C 4の分子相対親和性はヒトインシュリンに対するよりも5倍大きく、例1からのレゾルフィン標識ペプチドに対する分子相対親和性はヒトインシュリンに対するよりも1.8倍大きい。従つてペプチド誘導体はヒトインシュリンよりも若干弱く検出されるという結果になる。

例5

蛍光偏光免疫検定法によるインシュリンの測定

0.1 M 磷酸カリウム緩衝液(pH 7.8) 1935 μ lに、試料20 μ l、クローン2 E 8($8.4 \cdot 10^{-6}$ mol/l IgG)の腹水症溶液20 μ lおよび例1からのレゾルフィン標識ペプチドの溶液25 μ lを加える。

37℃で5分恒温保持した後、蛍光偏光を測定する(励起波長: 575 nm、発光波長: 594 nm)。

蛍光分光計F4.000(日立製)、偏光測定ヘッドあり。

このようにして得られた校正曲線を第1図で示す。各測定点は3回の個々の測定からの平均値である。

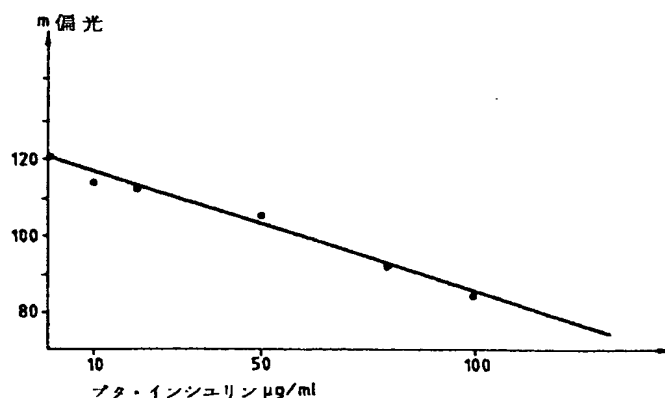
4 図面の簡単な説明

第1図はインシュリン測定時における蛍光偏光の校正曲線のグラフである。

271

272

Fig 1



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 3	識別記号	庁内整理番号
G 01 N 33/577	A	7906-2G
//C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

⑦発明者	ハンスーゲーオルク・ バツツ	ドイツ連邦共和国トゥツイング・トラウビンガー・シュト ラーセ 63
⑦発明者	ウルリヒ・エーシツヒ	ドイツ連邦共和国ブラネツグ・ホーフマルクシュトラーセ 22
⑦発明者	クルト・ヴァルター・ ナウヨークス	ドイツ連邦共和国ベンツベルク・ブーヘンシュトラーセ 3